

TFPI-2, an inhibitor of proteases and tumoral invasion

Pascale Reverdiau, Florent Hubé, Sophie Iochmann, Yves Gruel

► **To cite this version:**

Pascale Reverdiau, Florent Hubé, Sophie Iochmann, Yves Gruel. TFPI-2, an inhibitor of proteases and tumoral invasion. *Hématologie*, John Libbey Eurotext, 2003. hal-02127402

HAL Id: hal-02127402

<https://hal-univ-paris.archives-ouvertes.fr/hal-02127402>

Submitted on 21 May 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

TFPI-2, an inhibitor of proteases and tumoral invasion

Auteur(s) : Pascale Reverdiau, Florent Hubé, Sophie Iochmann, Yves Gruel

Laboratoire d'hémostase, EA 3249 cellules hématopoïétiques, hémostase et greffe, IFR 120, faculté de médecine, 2 bis, boulevard Tonnellé, 37032 Tours, cedex, France

Le TFPI-2 (*tissue factor pathway inhibitor 2*), caractérisé dans les années 1990, est identique à la protéine placentaire 5 ou PP5 [1], initialement isolée à partir du placenta humain [2]. Cette glycoprotéine matricielle, appelée aussi *matrix-associated serine protease inhibitor* (MSPI) par Rao *et al.* [3, 4], est un inhibiteur de protéases à site sérine de type Kunitz dont l'implication dans différents processus physiologiques et pathologiques se révèle particulièrement importante. En effet, le TFPI-2, synthétisé par de nombreuses cellules normales et certaines cellules tumorales, serait impliqué dans la régulation de la coagulation sanguine et surtout de la migration cellulaire, de l'invasion tumorale, de l'apoptose mais également de l'athérosclérose.

Origine cellulaire du TFPI-2

Le TFPI-2, initialement isolé du placenta humain par chromatographie d'affinité sur colonne d'héparine-sépharose, est retrouvé en abondance dans ce tissu [2]. Dosé dans le plasma par immunofluorométrie, sa concentration est comprise entre 0,43 à 0,49 µg/L chez l'adulte et augmente de 40 à 70 fois chez la femme enceinte et de 10 à 40 fois lors de traitements par l'héparine non fractionnée [5-7]. La localisation cellulaire du TFPI-2 dans le placenta reste cependant encore discutée. L'ARNm a été détecté, par hybridation *in situ*, dans le syncytiotrophoblaste bordant les villosités placentaires au contact du sang maternel et ceci du premier au troisième trimestre de la grossesse [8]. La protéine est également retrouvée dans les cellules syncytiotrophoblastiques [9], et plus précisément à la surface des microvillosités et dans le réticulum endoplasmique de ces cellules [10]. Dans la couche cytotrophoblastique sous-jacente à partir de laquelle se différencie le syncytiotrophoblaste, les transcrits du TFPI-2 sont détectés en grande quantité [11] mais la protéine n'est pas retrouvée [10]. D'autres organes et tissus humains produisent également du TFPI-2 comme le foie, les muscles squelettiques, le cœur, l'estomac, le sein, le côlon et le pancréas [12, 13]. Chez la souris, les transcrits du TFPI-2 sont également retrouvés par Northern-blotting dans le placenta et l'utérus mais aussi dans le foie et le rein de l'adulte et de l'embryon [14]. Seules des bandes de faibles intensités sont observées dans le cœur, le poumon, la rate et l'intestin grêle mais le transcrit du TFPI-2 n'est pas détecté dans le cerveau [14]. De nombreuses cellules synthétisent du TFPI-2, telles que les cellules endothéliales veineuses et artérielles [15, 16], les cellules mésenchymateuses et fibroblastiques MRC-5 [15, 17], les kératinocytes [3], les cellules épithéliales [18, 19], les cellules musculaires lisses artérielles [20, 21] ou encore les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques [22]. Les cellules endothéliales sécrètent 75 à 90 % de la molécule vers la matrice extracellulaire (MEC) [4, 16, 23] où le TFPI-2 s'associe aux glycosaminoglycanes (GAG), notamment à l'acide hyaluronique, au chondroïtine sulfate, à l'héparane sulfate, au dermatane sulfate, au kératane sulfate, au collagène de type I, à la vitronectine, au fibrinogène, à la laminine-5 et à l'héparine mais pas au collagène de type IV, à la fibronectine ou à la laminine-1 [24, 25]. Le TFPI-2 non sécrété vers la MEC, soit 5 à 25 %, reste associé à la membrane avec seulement 2 % de la protéine libérée dans le milieu de culture. En revanche, lorsque les cellules sont stimulées par un ester de phorbol, le phorbol myristate acétate ou PMA, le TFPI-2 est sécrété dans le milieu de culture avec également une augmentation de son activité retrouvée dans le lysat cellulaire et dans la matrice extracellulaire [15].

Le PMA est actuellement le seul inducteur reconnu de l'expression du TFPI-2 *in vitro* mais aucun équivalent physiologique n'a encore été identifié. Les effets du TNF- α sont discutés et dépendent du type cellulaire étudié. Certains auteurs montrent que l'expression du TFPI-2 est augmentée dans les cellules endothéliales stimulées par le TNF- α [26] ou les cellules musculaires lisses incubées avec cette cytokine ou avec l'interleukine-1 β [27]. En revanche, l'expression constitutive du TFPI-2 par les monocytes ou les cellules choriocarcinomeuses n'est pas affectée par ces cytokines ou par le LPS [27, 28]. La technologie des puces à ADN (*microarrays* ou *chips*) a permis de montrer une augmentation, d'au moins huit fois, du taux d'ARNm du TFPI-2 24 heures après l'infection de cellules fibroblastiques par le cytomégalovirus [29].

Gène du TFPI-2

Le gène du TFPI-2 humain est situé sur le chromosome 7 (7q22) comme d'autres gènes codant des inhibiteurs de protéases à site sérine, notamment celui du PAI-1 (dans la région 7 q2-q3) [30]. Le gène du TFPI-2 de 7 kb comprend cinq exons séparés par quatre introns (*figure 1*). Le gène est constitué d'un promoteur, d'une région 5' non codante de 75 pb, de la région codante de 705 nucléotides et d'une région 3' non codante de 235 nucléotides [31]. L'exon 1 du gène code le peptide signal N-terminal, les exons 2 à 4 codent les trois domaines de Kunitz et l'exon 5 la partie C-terminale de la molécule. Le promoteur du gène ne comporte ni boîte TATA ni boîte CAAT mais plusieurs sites d'initiation de la transcription (*figure 1*). Un site majeur ainsi que deux sites mineurs ont été localisés respectivement en -75, -49 et -38 en amont du site d'initiation de la traduction (ATG) [31-33]. La présence de ces sites au sein d'une séquence promotrice riche en GC ainsi que l'absence de boîte TATA et CAAT permet de classer le gène du TFPI-2 dans la famille des *housekeeping genes* ou gènes domestiques [33]. La région promotrice proximale contient également de nombreux sites potentiels de fixation pour des facteurs de transcription, tels que MyoD, LYF-1, NFY, GATA, oct-1, AP-1, Sp1, NF1, NF- κ B et *egr-1*. Le rôle de ces sites dans la modulation de l'expression du gène du TFPI-2 a été étudié par plusieurs auteurs en mesurant l'activité de promoteurs partiellement délétés et contrôlant l'expression d'un gène rapporteur codant la luciférase ou la β -galactosidase. Ces constructions ont été transfectées soit dans des cellules endothéliales médullaires TrBMEC [32], des cellules Hs683 et SNB19 issues de gliomes [34] ou encore dans les cellules choriocarcinomeuses JEG-3 [33]. Ces auteurs s'accordent pour identifier une région suffisante pour l'expression basale et inductible du gène TFPI-2 située entre -350 et -80 en amont de l'ATG [32-34]. Cette région comprend deux sites chevauchants *egr-1/Sp1*, un site AP-1 proximal et deux sites AP-1 distaux ainsi qu'un site NF- κ B [32-34]. Plusieurs de ces sites, notamment les sites AP-1, seraient importants pour l'induction de l'expression du gène TFPI-2 par le PMA (*figure 1*). En effet, le PMA initie la voie de signalisation Ras/Raf/MEK/ERK ; celle-ci induit la transcription des gènes *fos* et *c-jun*. L'hétérodimère Jun/Fos se fixe aux sites AP-1 et induit alors l'activation du promoteur du gène du TFPI-2 puis la transcription du gène [34, 35]. L'activation de la voie de signalisation dépendante de JNK induit également une augmentation de l'expression du TFPI-2 [36] et pourrait impliquer les sites *egr-1/Sp1*. Bien que l'induction de l'expression du TFPI-2 par le TNF- α soit variable d'un type cellulaire à l'autre, il est probable qu'elle soit, tout au moins partiellement, dépendante de NF- κ B [37]. La plupart des sites de fixation pour les facteurs de transcription sont bien conservés chez la souris bien que les gènes TFPI-2 des deux espèces présentent des caractéristiques différentes. Ainsi, le gène TFPI-2 murin de 9,3 kb comprend cinq exons et quatre introns et est situé sur le chromosome 6. Il possède une boîte TATA située en -795 de l'ATG, une boîte GC et deux

boîtes

CAAT

[38].

Le promoteur du gène du TFPI-2 humain a également la particularité d'être très riche en résidus CG et de contenir un îlot CpG, s'étalant de la région promotrice jusqu'à l'exon 2. Une méthylation anormale de cet îlot CpG serait associée à la répression transcriptionnelle du gène du TFPI-2 dans plusieurs lignées de cellules tumorales [39, 40].

ARN messenger

Par Northern-blotting, un transcrit majeur d'environ 1,4 kb et un transcrit mineur d'environ 2 kb ont été détectés dans les cellules endothéliales humaines ou les cellules placentaires [12, 31]. Ces deux transcrits seraient liés à la présence de deux sites de polyadénylation. Le gène du TFPI-2 étant surexprimé dans le placenta, des transcrits de 2,2 et 2,8 kb sont également retrouvés dans ce tissu, leur présence pouvant être due à un épissage incomplet [12].

Protéine

Le TFPI-2 humain mature, après clivage du peptide signal de 22 acides aminés, est une glycoprotéine de 32 kDa composée de 213 acides aminés dont 18 cystéines et qui possède deux sites potentiels de N-glycosylation (séquences Asn-X-Thr/Ser) situés en Asn-94 et Asn-148 [31]. En fonction du degré de glycosylation, des molécules de taille variable ont été détectées dans la matrice extracellulaire. La forme native de 25,5 kDa est non glycosylée alors que les molécules de 27 et 30 kDa sont partiellement glycosylées. Il est probable que la glycosylation soit nécessaire pour permettre la sécrétion rapide des inhibiteurs de 32, 30 et 27 kDa appelés « TFPI-2 triplet » mais elle ne serait pas indispensable à leur fixation aux composants de la matrice ni à leur activité inhibitrice [4]. Les structures protéiques des TFPI-2 humain, de la souris et du rat ont été déduites des séquences d'ADNc précédemment décrites [14, 31, 41]. Cet inhibiteur de protéases à site sérine est constitué de trois domaines de type Kunitz (K) comportant chacun trois ponts disulfures, d'une courte région amino-terminale chargée négativement avec trois résidus d'acide glutamique et d'une région carboxy-terminale de 27 acides aminés, riche en acides aminés basiques dont 5 résidus lysine consécutifs ([figure 2](#)). La modélisation 3D du domaine K1 du TFPI-2 humain montre que sa structure tridimensionnelle est extrêmement voisine de celle des domaines de Kunitz d'autres inhibiteurs possédant cette structure. Ce domaine K1 du TFPI-2 présente un feuillet β constitué de deux brins antiparallèles de l'arginine 20 à la phénylalanine 33 et une hélice α constituée de deux tours, du tryptophane 48 à l'alanine 54, du côté C-terminal. Cette structure est stabilisée par trois ponts disulfures en position 5-55, 14-38 et 30-51 et retrouvés dans tous les domaines de Kunitz ([figure 3](#)). Le TFPI-2 présente des analogies avec le TFPI-1 (32 % sur l'ensemble de la molécule). L'analyse phylogénétique réalisée pour les trois domaines de Kunitz du TFPI-1 et du TFPI-2 montre que ces deux inhibiteurs sont orthologues puisqu'ils ont divergé à la suite d'un événement de spéciation ([figure 4](#)). Alors que les domaines K2 et K3 du TFPI-1 et du TFPI-2 dérivent probablement d'un même domaine ancestral, les domaines K1 du TFPI-2 et du TFPI-1 sont plus éloignés les uns des autres, le K1 des TFPI-2 apparaissant plus proche du K3..

Activités anti-protéases du TFPI-2

Le TFPI-2 inhibe de nombreuses protéases à site sérine dont certaines sont impliquées dans les processus de la coagulation et de la fibrinolyse. Bien que la structure du TFPI-2 soit proche de celle du TFPI-1, son activité inhibitrice s'exerce vis-à-vis d'une gamme de protéases à sérine plus variée. Le TFPI-2 inhibe en effet fortement les activités amidolytiques de la trypsine, de la plasmine, du facteur XIa, de la chymotrypsine et de la kallikréine plasmatique (mesurées avec des substrats synthétiques spécifiques) avec des K_i respectivement de 2, 3, 15, 18 et 25 nM [42]. Les activités gélatinolytiques et caséinolytiques de la trypsine, de la chymotrypsine et de la plasmine sont de même fortement inhibées [3]. Le TFPI-2 est aussi un inhibiteur, mais plus faible, de l'activation du facteur X par le complexe IXa/polylysine ($K_i = 410$ nM), de la cathepsine G ($K_i = 200$ nM) et de l'activité amidolytique du complexe facteur tissulaire/VIIa. L'héparine augmente légèrement l'inhibition de l'activité amidolytique de la plasmine et celle du complexe facteur tissulaire/VIIa [31]. Enfin, le TFPI-2 n'inhibe pas significativement la kallikréine glandulaire, l'activateur urinaire du plasminogène (uPA), l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA), la protéine C activée, le facteur Xa, la thrombine et l'élastase leucocytaire [42].

L'association entre le TFPI-2 et l'héparine ou les GAG de la MEC, qui sont chargés négativement, impliquerait plusieurs résidus arginine du TFPI-2 chargés positivement. Le TFPI-2 contient en effet trois arginines dans son premier domaine de Kunitz (K1) et quatre arginines dans le troisième (K3), un ou plusieurs de ces résidus pouvant ainsi participer aux interactions TFPI-2/MEC (*figure 2*). Un analogue de la lysine, l'acide 6 aminohexanoïque, ne modifie pas l'association du TFPI-2 avec la matrice, excluant un rôle des résidus lysine de la partie C-terminale de la molécule pour son interaction avec les GAG. La conformation du TFPI-2, plus particulièrement l'intégrité de ses ponts disulfures, est essentielle à sa fixation à l'héparine et à la MEC [24].

L'inhibition des protéases à sérine par le TFPI-2 implique le résidu P1 du K1, c'est-à-dire une arginine, qui interagit avec l'enzyme. Par mutagenèse dirigée, Kamei *et al.* ont d'ailleurs montré que le mutant R24Q TFPI-2, qui résulte en fait d'une substitution de l'arginine 15 par une glutamine (en position 24 pour Kamei *et al.*), perd son activité inhibitrice vis-à-vis de la trypsine et de la plasmine [43]. La modélisation de l'interaction du K1 du TFPI-2 avec la plasmine confirme que les charges positives de l'Arg 15 du TFPI-2 réagissent avec les charges négatives de l'Asp 189 située dans la crevasse de la plasmine (*figure 5*). Cette interaction est stabilisée par des liaisons hydrogènes impliquant les résidus Ser 195, Ser 214, Gly 193, Gly 216 et Gly 218 de la plasmine [44]. Chez la souris, le résidu P1 du K1 est une glutamine [14] mais, à ce jour, aucune étude n'a été réalisée afin d'évaluer le pouvoir inhibiteur du TFPI-2 murin vis-à-vis de la trypsine, de la plasmine, du complexe FT/VIIa ou d'autres protéases à sérine.

Alors que les résidus P1 des domaines K1 du TFPI-2 humain et K1, K2 du TFPI-1 humain sont des arginines ou des lysines, le résidu équivalent sur le K2 du TFPI-2 humain est un acide glutamique. Ceci pourrait donc expliquer l'absence d'inhibition du facteur Xa par le TFPI-2 et ainsi son plus faible pouvoir inhibiteur vis-à-vis du complexe FT/VIIa par rapport à celui exercé par le TFPI-1. De plus, le domaine K2 du TFPI-2 est inhabituel puisqu'il comporte deux acides aminés supplémentaires entre les 4^e et 5^e résidus cystéines, entraînant une boucle plus longue que pour la plupart des autres inhibiteurs de type Kunitz [31, 45].

En ce qui concerne les domaines K3 des TFPI-2 humain et murin mais aussi du rat, le résidu P1 est une sérine [14, 41]. Les résidus P1 du K2 et du K3 étant bien conservés dans les trois

espèces, ceci suggère un rôle de ces derniers dans la spécificité de l'inhibiteur vis-à-vis de son substrat.

TFPI-2 et embryogenèse

Une étude préliminaire récente montre que le TFPI-2 ne serait pas essentiel pour l'embryogenèse. En effet, les embryons de souris dont le gène du TFPI-2 a été délété du promoteur proximal, du site majeur d'initiation de transcription et de l'exon 2 (souris homozygotes TFPI-2^{-/-}) ont le plus souvent un développement normal jusqu'à l'âge adulte et ceci en dépit de l'absence de TFPI-2 dans le placenta et les tissus embryonnaires. De plus, la gestation des femelles TFPI-2^{-/-} porteuses d'embryons invalidés est normale [46].

TFPI-2 et inhibition de l'invasion tumorale

Le TFPI-2 est synthétisé par certaines cellules tumorales, notamment celles issues d'un glioblastome humain, les cellules Hs683 [47], de tumeur bronchique comme la lignée A549 [48], d'un carcinome hépatocellulaire [49], de choriocarcinomes, les cellules JEG-3 et BeWo [28] ou encore de carcinomes ovariens telle la lignée T98G [12]. Les lignées cellulaires monocytaire U937 et lymphocytaire T Jurkat expriment également constitutivement du TFPI-2 [21]. Cet inhibiteur est également retrouvé dans les macrophages infiltrants les tumeurs gastriques, rénales, bronchiques non à petites cellules et les cellules du stroma tumoral dans le cancer gastrique. Des cellules néoplasiques isolées du sein, du côlon, du larynx, de l'estomac, du pancréas, du rein, de l'endomètre et du poumon expriment des taux variables de TFPI-2 [13].

Plusieurs travaux ont étayé l'hypothèse selon laquelle les métalloprotéinases (MMP), en dégradant les matrices extracellulaires, pouvaient favoriser l'invasion tumorale et donc les métastases. Les MMP sont activées par des protéases à sérine telles que la trypsine ou la plasmine ([figure 6](#)). La présence du récepteur de l'activateur du plasminogène de type urokinase (uPAR) à la surface de nombreuses cellules tumorales leur confère la capacité d'activer le plasminogène en plasmine et ainsi de générer des MMP actives. Plusieurs études récentes montrent que le TFPI-2, en inhibant directement la plasmine, peut réduire la libération de facteurs de croissance par les MEC, l'activation du *transforming growth factor-β* et de plusieurs MMP, limitant ainsi l'invasion tumorale [23]. Rao *et al.* [50] ont en effet été les premiers à montrer que le TFPI-2 recombinant pouvait inhiber la plasmine en milieu liquide mais également la plasmine générée dans la matrice extracellulaire ou à la surface des cellules fibrosarcomateuses HT-1080 qui sont particulièrement invasives. Le TFPI-2 recombinant (rTFPI-2) peut ainsi inhiber la dégradation du MatrigelTM (matrice préparée à partir d'un sarcome murin) et donc limiter l'invasion de ces cellules à travers cette MEC. Ces mêmes auteurs ont ensuite démontré que la plasmine, générée grâce à l'uPA fixée à son récepteur sur les cellules HT-1080 et HeLa, pouvait activer des proMMP-1 et proMMP3 en MMP-1 et MMP-3 [23]. Le TFPI-2, en inhibant la plasmine, régulerait la génération de MMP actives et limiterait ainsi la protéolyse de la matrice. Depuis, plusieurs équipes ont établi un lien entre le niveau d'expression du TFPI-2 et la progression de certaines tumeurs. Ainsi, les cellules A549, issues d'un cancer du poumon, produisent un taux élevé de TFPI-2 et sont peu invasives *in vitro*. Lorsque ces cellules sont transfectées par un vecteur exprimant un transcrite antisens, elles expriment alors moins d'ARNm et de protéine TFPI-2 et leur capacité à migrer à travers une MEC est alors augmentée [48]. Parallèlement, des cellules particulièrement invasives comme les cellules

fibrosarcomateuses HT-1080 [17] ou les cellules issues d'un cancer de la prostate humain (LNCaP) [51], d'un mélanome (C-32) [52] ou d'un choriocarcinome (JAR) [53], produisent peu de TFPI-2 à l'état basal, et ces résultats sont en faveur d'un rôle inhibiteur du TFPI-2 vis-à-vis de l'invasion tumorale. La transfection de ces cellules par un vecteur codant le TFPI-2 restaure en effet l'expression de cet inhibiteur et diminue leur potentiel d'invasion. Plus récemment, une étude réalisée sur des gliomes humains suggère également une corrélation inverse entre les taux d'ARNm et de protéine TFPI-2 et la gravité de la tumeur, l'expression du TFPI-2 étant diminuée durant la progression tumorale [47]. Les cellules issues d'un gliome de bas grade (Hs683) expriment en effet beaucoup de TFPI-2 alors que ce dernier n'est pas détecté dans les cellules SNB19, issues d'un gliome de haut grade. Des résultats similaires ont été obtenus, par hybridation *in situ*, à partir de biopsies cérébrales normales ou de gliomes [47]. De plus, le taux de TFPI-2 au sein de tumeurs du côlon, du larynx, de l'estomac, du pancréas, du rein, de l'endomètre, du sein et du poumon, apparaît d'autant plus bas que leur degré de malignité est élevé, soutenant un rôle du TFPI-2 dans la croissance et la stabilité tumorale [13].

Le rôle inhibiteur du TFPI-2 vis-à-vis de l'invasion tumorale *in vivo* est encore très peu étudié. En effet, seule une étude, réalisée avec des cellules choriocarcinomateuses JAR injectées par voie sous-cutanée chez des souris nues, montre une régulation locale de l'invasion lorsque les cellules sont transfectées avec un vecteur codant le TFPI-2. En revanche, les cellules JAR transfectées avec le vecteur contrôle envahissent le tissu musculaire sous-jacent [53]. Ce rôle inhibiteur du TFPI-2 dans l'invasion tumorale diffère cependant de celui qu'il exerce vis-à-vis de cellules issues d'un carcinome hépatocellulaire humain (HCC). Paradoxalement, le TFPI-2 recombinant potentialise l'effet pro-invasif du facteur de croissance hépatocytaire (HGF) sur ces cellules [49]. De plus, lorsque les cellules HCC sont transfectées par un vecteur permettant une expression de TFPI-2, elles deviennent spontanément invasives. Les cellules HCC expriment à leur surface du facteur tissulaire et synthétisent également du facteur VII. L'effet pro-invasif du TFPI-2, produit par les myofibroblastes du stroma, serait donc dû à sa fixation sur le complexe facteur tissulaire/VIIa préalablement formé à la surface cellulaire comme cela a été précédemment montré avec le TFPI-1 [54]. En conclusion, l'ensemble de ces arguments est en faveur d'un rôle inhibiteur du TFPI-2 vis-à-vis de la progression tumorale mise en jeu dans de nombreux cancers et plusieurs mécanismes ont été évoqués : 1. Des délétions dans la région 7q, où est localisé le gène du TFPI-2, sont fréquentes dans de nombreuses tumeurs malignes [55]. 2. La régulation négative de l'expression du TFPI-2 dans certaines cellules tumorales pourrait résulter de l'activation d'oncogènes. En effet, la synthèse des ARNm du TFPI-2 est diminuée dans les cellules MRC-5 surexprimant une forme activée du gène *H-ras* [17]. 3. Le TFPI-2 serait impliqué dans l'apoptose des cellules tumorales, inhibant ainsi la croissance de la tumeur. Cette hypothèse est étayée par les travaux de Tasiou *et al.* [56] montrant que, lorsque des cellules SNB-19 sont transfectées par un vecteur sens et produisant alors du TFPI-2, elles meurent par apoptose. Au contraire, les cellules Hs683, transfectées par un vecteur antisens, sont moins sensibles à l'apoptose. *In vitro*, l'augmentation de l'apoptose des cellules SNB-19 transfectées, paraît associée à une expression importante de molécules pro-apoptotiques comme les caspases 9,7 et 3, du complexe cytochrome-c/Apaf-1 responsable de l'activation de ces dernières et de la protéine BAX qui bloque Bcl-2.

TFPI-2 et athérosclérose

Le renouvellement de la matrice extracellulaire, la migration, l'invasion et la prolifération cellulaires sont des processus également impliqués dans l'athérosclérose. La balance entre dégradation et renouvellement de la MEC est déterminante dans la stabilité de la plaque

athéromateuse. La dégradation de la MEC par les métalloprotéinases jouerait en effet un rôle dans l'aggravation de l'athérosclérose et tout particulièrement dans la rupture des plaques. En revanche, en réduisant l'activité de ces MMP, le TFPI-2 associé à la MEC favoriserait la stabilité de la plaque. Des résultats expérimentaux montrent d'ailleurs une expression de TFPI-2 inversement corrélée à celle de MMP, particulièrement des MMP-1 et 13, au sein de la plaque athéromateuse [27]. Plusieurs types cellulaires sont impliqués dans l'athérogenèse et notamment les cellules musculaires lisses (CML) et les monocytes/macrophages. Les CML de phénotype contractile et localisées dans la média des vaisseaux artériels sont invasives et synthétisent de faibles taux de TFPI-2. Lors de l'athérogenèse, ces cellules migrent vers l'intima où elles acquièrent un phénotype prolifératif et sécrétoire, synthétisant des composants de la MEC ainsi que des taux plus élevés de TFPI-2 [20, 21]. Parallèlement, Shinoda *et al.* ont montré un effet mitogène autocrine du TFPI-2 sur des CML aortiques bovines. L'augmentation de c-fos *via* la voie des MAP kinases par du rTFPI-2 suggère sa fixation sur un récepteur encore non identifié [57]. À l'opposé, les monocytes qui se différencient au sein de la plaque en macrophages puis en cellules spumeuses joueraient un rôle crucial dans la rupture de plaque en raison de leur capacité à produire de grandes quantités de MMP alors qu'elles synthétisent très peu de TFPI-2 [27]. Le mécanisme inhibiteur du TFPI-2 sur les MMP au sein d'une plaque athéromateuse serait différent de celui exercé vis-à-vis de la plasmine. Herman *et al.* montrent en effet que le TFPI-2, tout comme les inhibiteurs spécifiques des MMP, les TIMP (*tissue inhibitors of MMPs*), inhiberait directement l'activité des MMP-1 et -13 et dans une moindre mesure celle des MMP-2 et 9 [27]. Cette inhibition, probablement liée à une interaction directe TFPI-2/MMP, mettrait en jeu des zones différentes de celles impliquées dans l'inhibition des protéases à sérine comme la plasmine [27]. D'autres travaux montrent d'ailleurs des analogies de structure entre la région N-terminale des TIMP et une région interne du TFPI-2 contenant de nombreux résidus cystéine [58, 59] qui serait impliquée dans l'inhibition directe des MMP-1, -2, -9 et -13.

Conclusion

Historiquement, c'est un rôle inhibiteur de la coagulation dépendante du complexe facteur tissulaire/facteur VIIa qui a tout d'abord été attribué au TFPI-2 en raison de son identité de structure avec le TFPI-1. En réalité, le TFPI-2 est un faible inhibiteur de la coagulation, mais son rôle dans l'inhibition de l'invasion tumorale se révèle en revanche primordial. En conclusion, le rôle important du TFPI-2 dans l'inhibition de l'invasion tumorale, la présence d'un îlot CpG dans la région encadrant les sites d'initiation de la transcription du gène et le fait que l'hyperméthylation du gène soit corrélée à l'inhibition de sa transcription, devraient permettre à terme de classer ce gène codant une anti-protéase dans le groupe des gènes suppresseurs de tumeur. Une meilleure connaissance des mécanismes régulant l'expression du TFPI-2 au sein de certaines tumeurs malignes pourrait contribuer au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques anticancéreuses n

RÉFÉRENCES

1. Kisiel W, Sprecher CA, Foster DC. Evidence that a second human tissue factor pathway inhibitor (TFPI-2) and human placental protein 5 are equivalent. *Blood* 1994 ; 84 : 4384-5.

2. Butzow R, Huhtala ML, Bohn H, Virtanen I, Seppala M. Purification and characterization of placental protein 5. *Biochem Biophys Res Commun* 1988 ; 150 : 483-90.
3. Rao CN, Peavey CL, Liu YY, Lapiere JC, Woodley DT. Partial characterization of matrix-associated serine protease inhibitors from human skin cells. *J Invest Dermatol* 1995 ; 104 : 379-83.
4. Rao CN, Reddy P, Liu Y, O'Toole E, Reeder D, Foster DC, Kisiel W, Woodley DT. Extracellular matrix-associated serine protease inhibitors (Mr 33,000, 31,000, and 27,000) are single-gene products with differential glycosylation: cDNA cloning of the 33-kDa inhibitor reveals its identity to tissue factor pathway inhibitor-2. *Arch Biochem Biophys* 1996 ; 335 : 82-92.
5. Butzow R, Alfthan H, Stenman UH, Suikkari AM, Bohn H, Seppala M. Immunofluorometric demonstration and quantification of placental protein 5 in the absence of pregnancy. *Clin Chem* 1988 ; 34 : 1591-3.
6. Seppala M, Wahlstrom T, Bohn H. Circulating levels and tissue localization of placental protein five (PP5) in pregnancy and trophoblastic disease: absence of PP5 expression in the malignant trophoblast. *Int J Cancer* 1979 ; 24 : 6-10.
7. Siiteri JE, Koistinen R, Salem HT, Bohn H, Seppala M. Placental protein 5 is related to blood coagulation and fibrinolytic systems. *Life Sci* 1982 ; 30 : 1885-91.
8. Udagawa K, Miyagi Y, Hirahara F, Miyagi E, Nagashima Y, Minaguchi H, Misugi K, Yasumitsu H, Miyazaki K. Specific expression of PP5/TFPI2 mRNA by syncytiotrophoblasts in human placenta as revealed by in situ hybridization. *Placenta* 1998 ; 19 : 217-23.
9. Butzow R, Virtanen I, Seppala M, Narvanen O, Stenman UH, Ristimaki A, Bohn H. Monoclonal antibodies reacting with placental protein 5: use in radioimmunoassay, Western blot analysis, and immunohistochemistry. *J Lab Clin Med* 1988 ; 111 : 249-56.
10. Udagawa K, Yasumitsu H, Esaki M, Sawada H, Nagashima Y, Aoki I, Jin M, Miyagi E, Nakazawa T, Hirahara F, Miyazaki K, Miyagi Y. Subcellular localization of PP5/TFPI-2 in human placenta: a possible role of PP5/TFPI-2 as an anti-coagulant on the surface of syncytiotrophoblasts. *Placenta* 2002 ; 23 : 145-53.
11. Hubé F, Reverdiau P, Iochmann S, Trassard S, Thibault G, Gruel Y. Demonstration of a tissue factor pathway inhibitor-2 messenger RNA synthesis by pure villous cytotrophoblast cells isolated from term human placentas. *Biol Reprod* 2003 ; 68 : 1888-94.
12. Miyagi Y, Koshikawa N, Yasumitsu H, Miyagi E, Hirahara F, Aoki I, Misugi K, Umeda M, Miyazaki K. cDNA cloning and mRNA expression of a serine proteinase inhibitor secreted by cancer cells: identification as placental protein 5 and tissue factor pathway inhibitor-2. *J Biochem (Tokyo)* 1994 ; 116 : 939-42.
13. Sierko E, Wojtukiewicz MZ, Zimnoch L, Kozlowski L, Sulkowski S, Kisiel W. Immunohistochemical localization of tissue factor pathway inhibitor-2 in human tumor tissue. *Blood* 2002 ; 100 : 486a (Abstract).

- 14.** Miyagi Y, Yasumitsu H, Mizushima H, Koshikawa N, Matsuda Y, Itoh H, Hori TA, Aoki I, Misugi K, Miyazaki K. Cloning of the cDNA encoding mouse PP5/TFPI-2 and mapping of the gene to chromosome 6. *DNA Cell Biol* 1996 ; 15 : 947-54.
- 15.** Rao CN, Liu YY, Peavey CL, Woodley DT. Novel extracellular matrix-associated serine proteinase inhibitors from human skin fibroblasts. *Arch Biochem Biophys* 1995 ; 317 : 311-4.
- 16.** Iino M, Foster DC, Kisiel W. Quantification and characterization of human endothelial cell-derived tissue factor pathway inhibitor-2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998 ; 18 : 40-6.
- 17.** Izumi H, Takahashi C, Oh J, Noda M. Tissue factor pathway inhibitor-2 suppresses the production of active matrix metalloproteinase-2 and is down-regulated in cells harboring activated ras oncogenes. *Febs Lett* 2000 ; 481 : 31-6.
- 18.** Ortego J, Escribano J, Coca-Prados M. Gene expression of proteases and protease inhibitors in the human ciliary epithelium and ODM-2 cells. *Exp Eye Res* 1997 ; 65 : 289-99.
- 19.** Deng FM, Ding M, Lavker RM, Sun TT. Urothelial function reconsidered: a role in urinary protein secretion. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001 ; 98 : 154-9.
- 20.** Blindt R, Vogt F, Lamby D, Zeiffer U, Krott N, Hilger-Eversheim K, Hanrath P, vom Dahl J, Bosserhoff AK. Characterization of differential gene expression in quiescent and invasive human arterial smooth muscle cells. *J Vasc Res* 2002 ; 39 : 340-52.
- 21.** Crawley JT, Goulding DA, Ferreira V, Severs NJ, Lupu F. Expression and localization of tissue factor pathway inhibitor-2 in normal and atherosclerotic human vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002 ; 22 : 218-24.
- 22.** Reverdiau-Moalic P, Iochmann S, Rideau E, Thibault G, Bardos P, Gruel Y. Simultaneous expression of tissue factor, tissue factor pathway inhibitor 1 and 2 in blood monocytes-derived macrophages. *Circulation* 1998 ; 98 : 525 (Abstract).
- 23.** Rao CN, Mohanam S, Puppala A, Rao JS. Regulation of ProMMP-1 and ProMMP-3 activation by tissue factor pathway inhibitor-2/matrix-associated serine protease inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun* 1999 ; 255 : 94-8.
- 24.** Liu Y, Stack SM, Lakka SS, Khan AJ, Woodley DT, Rao JS, Rao CN. Matrix localization of tissue factor pathway inhibitor-2/matrix-associated serine protease inhibitor (TFPI-2/MSPI) involves arginine-mediated ionic interactions with heparin and dermatan sulfate: heparin accelerates the activity of TFPI-2/MSPI toward plasmin. *Arch Biochem Biophys* 1999 ; 370 : 112-8.
- 25.** Rao CN, Reddy P, Reeder DJ, Liu Y, Stack SM, Kisiel W, Woodley DT. Prokaryotic expression, purification, and reconstitution of biological activities (Antiprotease, antitumor, and heparin-binding) for tissue factor pathway inhibitor-2. *Biochem Biophys Res Commun* 2000 ; 276 : 1286-94.
- 26.** Horrevoets AJ, Fontijn RD, van Zonneveld AJ, de Vries CJ, ten Cate JW, Pannekoek H. Vascular endothelial genes that are responsive to tumor necrosis factor-alpha in vitro are

expressed in atherosclerotic lesions, including inhibitor of apoptosis protein-1, stannin, and two novel genes. *Blood* 1999 ; 93 : 3418-31.

27. Herman MP, Sukhova GK, Kisiel W, Foster D, Kehry MR, Libby P, Schonbeck U. Tissue factor pathway inhibitor-2 is a novel inhibitor of matrix metalloproteinases with implications for atherosclerosis. *J Clin Invest* 2001 ; 107 : 1117-26.

28. Iochmann S, Reverdiau-Moalic P, Hubé F, Bardos P, Gruel Y. Demonstration of inducible TFPI-2 mRNA synthesis in BeWo and JEG-3 trophoblast cells using a competitive RT-PCR. *Thromb Res* 2002 ; 105 : 217-23.

29. Zhu H, Cong JP, Mamtora G, Gingeras T, Shenk T. Cellular gene expression altered by human cytomegalovirus: global monitoring with oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998 ; 95 : 14470-5.

30. Schwartz CE, Stanislovitis P, Phelan MC, Klinger K, Taylor HA, Stevenson RE. Deletion mapping of plasminogen activator inhibitor, type I (PLANH1) and beta-glucuronidase (GUSB) in 7q21-q22. *Cytogenet Cell Genet* 1991 ; 56 : 152-3.

31. Sprecher CA, Kisiel W, Mathewes S, Foster DC. Molecular cloning, expression, and partial characterization of a second human tissue-factor-pathway inhibitor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994 ; 91 : 3353-7.

32. Kamei S, Kazama Y, Kuijper JL, Foster DC, Kisiel W. Genomic structure and promoter activity of the human tissue factor pathway inhibitor-2 gene. *Biochim Biophys Acta* 2001 ; 1517 : 430-5.

33. Hubé F, Reverdiau P, Iochmann S, Cherpi-Antar C, Gruel Y. Characterization and functional analysis of TFPI-2 gene promoter in a human choriocarcinoma cell line. *Thromb Res* 2003 ; 109 : 207-15.

34. Konduri SD, Osman FA, Rao CN, Srinivas H, Yanamandra N, Tasiou A, Dinh DH, Olivero WC, Gujrati M, Foster DC, Kisiel W, Kouraklis G, Rao JS. Minimal and inducible regulation of tissue factor pathway inhibitor-2 in human gliomas. *Oncogene* 2002 ; 21 : 921-8.

35. Kast C, Wang M, Whiteway M. The ERK/MAPK pathway regulates the activity of the human tissue factor pathway inhibitor-2 promoter. *J Biol Chem* 2003 ; 278 : 6787-94.

36. Wolter S, Mushinski JF, Saboori AM, Resch K, Kracht M. Inducible expression of a constitutively active mutant of mitogen-activated protein kinase kinase 7 specifically activates c-JUN NH2-terminal protein kinase, alters expression of at least nine genes, and inhibits cell proliferation. *J Biol Chem* 2002 ; 277 : 3576-84.

37. Hinz M, Lemke P, Anagnostopoulos I, Hacker C, Krappmann D, Mathas S, Dorken B, Zenke M, Stein H, Scheidereit C. Nuclear factor kappaB-dependent gene expression profiling of Hodgkin's disease tumor cells, pathogenetic significance, and link to constitutive signal transducer and activator of transcription 5a activity. *J Exp Med* 2002 ; 196 : 605-17.

38. Kazama Y, Kamei S, Kuijper JL, Foster DC, Kisiel W. Nucleotide sequence of the gene encoding murine tissue factor pathway inhibitor-2. *Thromb Haemost* 2000 ; 83 : 141-7.

- 39.** Hubé F, Reverdiau P, Iochmann S, Rollin J, Cherpi-Antar C, Gruel Y. Transcriptional silencing of TFPI-2 gene by hypermethylation of the promoter in choriocarcinoma cells. *Biol Chem* 2003 ; 384 : 1029-34.
- 40.** Rao CN, Segawa T, Navari JR, Xu L, Srivastava S, Moul JW, Phillips B. Methylation of TFPI-2 gene is not the sole cause of its silencing. *Int J Oncol* 2003 ; 22 : 843-8.
- 41.** Hisaka T, Kisiel W, Rosenbaum J. cDNA cloning and tissue distribution of the rat ortholog of tissue factor pathway inhibitor-2. *Thromb Haemost* 2002 ; 88 : 356-7.
- 42.** Petersen LC, Sprecher CA, Foster DC, Blumberg H, Hamamoto T, Kisiel W. Inhibitory properties of a novel human Kunitz-type protease inhibitor homologous to tissue factor pathway inhibitor. *Biochemistry* 1996 ; 35 : 266-72.
- 43.** Kamei S, Petersen LC, Sprecher CA, Foster DC, Kisiel W. Inhibitory properties of human recombinant Arg24→Gln type-2 tissue factor pathway inhibitor (R24Q TFPI-2). *Thromb Res* 1999 ; 94 : 147-52.
- 44.** Hubé F, Reverdiau P, Iochmann S, Gruel Y. 3D modeling of human TFPI-2 kunitz-type protease inhibitor complexed with human plasmin. *Thromb Res* 2003 ; 111 : 197-8.
- 45.** Miyagi Y, Yasumitsu H, Eki T, Miyata S, Kkawa N, Hirahara F, Aoki I, Misugi K, Miyazaki K. Assignment of the human PP5/TFPI-2 gene to 7q22 by FISH and PCR-based human/rodent cell hybrid mapping panel analysis. *Genomics* 1996 ; 35 : 267-8.
- 46.** Kazama Y, Souri M, Kisiel W, Degen J. Tissue factor pathway inhibitor-2 (TFPI-2) deficiency is compatible with development, growth to adulthood, and fertility. *Résumé de l'American Society of Hematology, Blood* 2002 ; 100 : 486a.
- 47.** Rao CN, Lakka SS, Kin Y, Konduri SD, Fuller GN, Mohanam S, Rao JS. Expression of tissue factor pathway inhibitor 2 inversely correlates during the progression of human gliomas. *Clin Cancer Res* 2001 ; 7 : 570-6.
- 48.** Lakka SS, Konduri SD, Mohanam S, Nicolson GL, Rao JS. *In vitro* modulation of human lung cancer cell line invasiveness by antisense cDNA of tissue factor pathway inhibitor-2. *Clin Exp Metastasis* 2000 ; 18 : 239-44.
- 49.** Neaud V, Hisaka T, Monvoisin A, Bedin C, Balabaud C, Foster DC, Desmouliere A, Kisiel W, Rosenbaum J. Paradoxical pro-invasive effect of the serine proteinase inhibitor tissue factor pathway inhibitor-2 on human hepatocellular carcinoma cells. *J Biol Chem* 2000 ; 275 : 35565-9.
- 50.** Rao CN, Cook B, Liu Y, Chilukuri K, Stack MS, Foster DC, Kisiel W, Woodley DT. HT-1080 fibrosarcoma cell matrix degradation and invasion are inhibited by the matrix-associated serine protease inhibitor TFPI-2/33 kDa MSPI. *Int J Cancer* 1998 ; 76 : 749-56.
- 51.** Konduri SD, Tasiou A, Chandrasekar N, Rao JS. Overexpression of tissue factor pathway inhibitor-2 (TFPI-2), decreases the invasiveness of prostate cancer cells in vitro. *Int J Oncol* 2001 ; 18 : 127-31.

- 52.** Konduri SD, Tasiou A, Chandrasekar N, Nicolson GL, Rao JS. Role of tissue factor pathway inhibitor-2 (TFPI-2) in amelanotic melanoma (C-32) invasion. *Clin Exp Metastasis* 2000 ; 18 : 303-8.
- 53.** Jin M, Udagawa K, Miyagi E, Nakazawa T, Hirahara F, Yasumitsu H, Miyazaki K, Nagashima Y, Aoki I, Miyagi Y. Expression of serine proteinase inhibitor PP5/TFPI-2/MSPI decreases the invasive potential of human choriocarcinoma cells in vitro and in vivo. *Gynecol Oncol* 2001 ; 83 : 325-33.
- 54.** Fischer EG, Riewald M, Huang HY, Miyagi Y, Kubota Y, Mueller BM, Ruf W. Tumor cell adhesion and migration supported by interaction of a receptor-protease complex with its inhibitor. *J Clin Invest* 1999 ; 104 : 1213-21.
- 55.** Atkin NB, Baker MC. Chromosome 7q deletions : observations on 13 malignant tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 1993 ; 67: 123-5.
- 56.** Tasiou A, Konduri SD, Yanamandra N, Dinh DH, Olivero WC, Gujrati M, Obeyesekere M, Rao JS. A novel role of tissue factor pathway inhibitor-2 in apoptosis of malignant human gliomas. *Int J Oncol* 2001 ; 19 : 591-7.
- 57.** Shinoda E, Yui Y, Hattori R, Tanaka M, Inoue R, Aoyama T, Takimoto Y, Mitsui Y, Miyahara K, Shizuta Y, Sasayama S. Tissue factor pathway inhibitor-2 is a novel mitogen for vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1999 ; 274 : 5379-84.
- 58.** Welm B, Mott J, Werb Z. Developmental biology: vasculogenesis is a wreck without RECK. *Curr Biol* 2002 ; 12 : R209-11.
- 59.** Baker AH, Edwards DR, Murphy G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci* 2002 ; 115 : 3719-27.